

Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schwarz

Die Glykokalix der Erythrozyten
und ihre Bedeutung für die
Antigen - Antikörper - Reaktion
(Elektronenmikroskopische Untersuchungen)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Konstantin Sykiotis
aus Agios Konstantinos/Lokridos/-Griechenland-

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549013_0056

Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schwarz

Die Glykokalix der Erythrozyten
und ihre Bedeutung für die
Antigen - Antikörper - Reaktion
(Elektronenmikroskopische Untersuchungen)

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Konstantin Sykiotis

aus Agios Konstantinos/Lokridos/-Griechenland-

Referent: Prof. Dr.med. H. Schwarz
Korreferent: Prof. Dr.med. E. Stoecker



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. Mai 1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	2
Material und Methode	9
Untersuchungsergebnisse	13
Diskussion	29
Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33

Einleitung

Lichtmikroskopisch konnte an der Oberfläche von Zellen eine Grenzschicht bzw. Membran in der Regel nicht festgestellt werden. Auf ihr Vorhandensein wurde aus dem Schrumpfen bzw. dem Schwellen von Zellen in hypertonen bzw. hypotonen Lösungen und aus der Beobachtung des Ausfliessens von Cytoplasma nach Anstich der Zelloberfläche mit der Nadel eines Mikromanipulators geschlossen (29).

Nachdem es gelungen war, dünne Zellschnitte elektronenmikroskopisch zu untersuchen, konnte die Existenz einer das Cytoplasma begrenzenden Membran in Form einer dünnen, linearen Kontur mit Abmessungen von 80 bis 100 Å Dicke bestätigt werden (Cytomembran). Diese Schicht besteht aus zwei dunklen, je 30 Å dicken Linien und einer trennenden, klaren Zwischenzone von ungefähr gleichem Kaliber (29, 18). Diese als Elementar- oder Einheitsmembran bezeichnete Schicht besteht chemisch aus geordneten Lipoprotein-Systemen, in denen eine bimolekulare Lipidschicht mit einem die innere und äussere Grenzfläche bedeckenden Proteinfilm kombiniert ist (29).

Viele Zellarten haben ausserhalb dieser Elementarmembran, wie später ausführlich beschrieben, eine polysaccharidreiche Oberflächendeckschicht. Die Wände der Pflanzenzellen, die Cuticulae der Insektenepidermis und die Zona pellucida der Eizellen sind dafür bekannte Beispiele (9).

Das Elektronenmikroskop hat bei zahlreichen Zellarten unter Verwendung verschiedener Färbemethoden eine Deckschicht, chemisch aus Polysacchariden und Protein bestehend, oberhalb der Elementarmembran gezeigt, welche vorher lichtmikroskopisch unentdeckt geblieben war (29, 18). BENNETT hat 1963 die Bezeichnung Glykokalyx (glykys (gr.) = süß, o kalyx (gr.) = Kelch - Kapsel) als Sammelbegriff aller extrazellulären, kohlenhydratreichen Deckschichten vorgeschlagen (9). Die Ausbildung der Glykokalix ist bei den einzelnen Zellarten verschieden stark, ebenso wie ihre Morphologie erhebliche Unterschiede aufweist. Die Annahme, eine solche Oberflächenschicht sei bei allen Zellarten vorhanden, ist bis jetzt nicht ausreichend bewiesen.

Allgemein gesehen stellt die Glykokalix morphologisch an der Zellmembranoberfläche eine körnige, färbungsabhängige Schicht dar, welche bei manchen Zellarten teilweise feine Filamente aufweist (9, 29, 18). Die Glykokalix folgt nicht kontinuierlich den Zellmembranausstülpungen und Einfaltungen (Mikrovilli und Krypten), sondern umgibt die Zellmembran ohne konstanten Oberflächenkontakt wie ein Filter (9, 29). Auch bei den uns hier besonders interessierenden Erythrozyten ist eine Glykokalix vorhanden, die nur nach Anwendung besonderer Fixierungen und histochemischen Färbemethoden nachgewiesen werden kann.

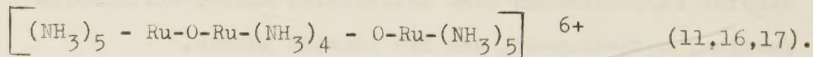
Bei den zur morphologischen Darstellung der Glykokalix angewandten Färbemethoden sind kolloidales Eisen, kolloidales Thorium, Ruthenium-Rot und PAS benutzt worden.

Eine Fixierung mit kolloidalem Eisen färbt die sauren Polysaccharide bei einem pH unterhalb von 2,5 (Optimum 1,7). Bei niedriger Elektrolytkonzentration nehmen alle Anionen die Färbung an; dagegen nimmt die Färbung bei steigender Elektrolytkonzentration ab. Demnach kann die Reduzierung der Farbbindung je nach Molarität der Salzlösung ein empfindlicher Test für die Trennung von Carbonsäuren sein (13).

Eine exakte Darstellung der Mucopolysaccharide und Glucoproteine ist mit dieser Technik jedoch nicht möglich, da beide Moleküle Anionengruppen enthalten. Dazu kommt, dass die Färbung mit kolloidalem Eisen unter dem Elektronenmikroskop weniger spezifisch ist, weil auch intrazelluläre, Carbonylgruppen enthaltende Bestandteile, wie der Golgi-Apparat, gefärbt werden (13).

Bei der Alternativfärbmethode unter Verwendung von kolloidalem Thorium benutzt man eine 1%-ige Thoriumlösung (pH 2,6). Die Spezifität der Anfärbung mit Thoriumpartikeln entspricht derjenigen von Eisenpartikeln. Die Empfindlichkeit der Färbetechnik mit kolloidalem Thorium ist im Elektronenmikroskop geringer als im Lichtmikroskop, jedoch sind gute Ergebnisse bei der Färbung von ultradünnen Schnitten erzielt worden. Ein deutlicher Mangel besteht in der ungenügenden Kontrastierung der Bilder (1, 22, 23).

Der nächste Farbstoff, das Ruthenium-Rot (RR), ist ein Metallkomplex mit folgender Strukturformel:



Es präzipitiert als 6-wertiges Kation eine Vielzahl von Polyanionen. In tierischem Gewebe färbt RR vor allem extrazelluläres Material, welches aus sauren Mucopolysacchariden besteht. Insbesondere färbt RR Chondroitinsulfate, Hyaluronsäure, Keratansulfate, Galakturonsäureketten, Pectine, Heparin, DNA, RNA, bestimmte Fettsäuren (Phospholipide) (16,17).

RR zeigt keine Reaktion mit neutralen Mucopolysacchariden und Polypeptiden. Es penetriert nicht in das Zellinnere bei unzerstörten Zellen und zeigt eine feinkörnige, kontrastreiche Färbung an den Zelloberflächen (16, 17).

Erythrozyten binden RR sichtbar als dünne Schicht in Angrenzung an die Aussenlage der Cytomembran.

In Schrägschnitten ist diese dünne Schicht aber nicht homogen, sondern erinnert an ein inhomogenes Filamentgeflecht ähnlich der Struktur von Löschpapier (16,17).

Die Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) beruht darauf, dass die Polysaccharide durch Perjodsäure oxydiert werden, wodurch freie Aldehydgruppen entstehen, die sich dann mit fuchsin-schwefeliger Säure - gleich Schiff'sches Reagenz - zu einem roten Farbstoff verbinden. Mit der PAS-Reaktion lassen sich Mucopolysaccharide, Glykoproteide und Glykolipide im Lichtmikroskop nachweisen (22).

Die Glykokalix wird von den einzelnen Zellen selbst synthetisiert. Die vermutlich im Golgi-Komplex synthetisierten Kohlenhydrate werden an die im endoplasmatischen Retikulum gebildeten Proteine gebunden und an die Zelloberfläche als Glykokalix abgegeben (18).

Die Glykokalix der Erythrozyten stellt eine Oberflächenschicht aus Polysacchariden und Mucoproteinen dar. Die Mucoproteine enthalten in ihrem Zuckeranteil kleinere Oligosaccharidketten, deren Enden einerseits aus Sialyl-Galaktose, andererseits aus Sialyl-N-Acetylhexosamin bestehen. Sie sind über O-Glykosidketten mit Serin und Threonin und über Glycosidester mit Glutaminsäure verbunden (2,22). Funktionell beeinflusst die Glykokalix viele Eigenschaften der gesamten Zelle und besonders der darunterliegenden Plasmamembran. Die Beschaffenheit der Glykokalix ist nicht auf eine bestimmte Dichte und Dicke fixiert, sondern beides kann sich vergrössern oder verkleinern, indem sich ihre Zwischenräume kürzen oder weiten. Durch diese variable Durchlässigkeit für unterschiedliche Molekülgrößen wird die osmotische Konzentration der Zelle aufrecht erhalten und der Ablauf des Stoffwechsels der Zelle gewährleistet. So ist es z.B. möglich, dass die Glykokalix dazu dient, die während einer Erregungswelle von der Zelle eliminierten K^+ -Ionen in unmittelbarer Nähe der Zellmembran zu konservieren. Dadurch können sie leicht durch Ionenpumpen wieder zurückgepumpt werden (2).

Die immunologischen Reaktionen der Zellen werden von vielen Autoren der Zellmembran und nicht näher spezifizierten Oberflächenschichten zugeordnet. So haben ROELKE, UHLENBRUCK und METAXAS (25) die Bedeutung der Neuraminsäure an der Oberfläche der Erythrozyten für die Entfaltung der Antigenität der MN-Blutgruppen und der HD_1/HD_2 -Antigene sowie für die Aktivität der

Myxovirusrezeptoren hervorgehoben. ILTZ, EBERT und WEICKER (20) haben mittels der Methode der Gaschromatographie die Glykoproteine der Erythrozytenmembran analysiert, weil sie glaubten, dass die Kohlenhydratseitenketten und ihre Verknüpfungen zum Proteingerüst Träger verschiedener Rezeptoren sind, die für MN-Blutgruppensysteme, Kälteagglutinine und Myxoviren verantwortlich sind. Ziel der Untersuchungen menschlicher Erythrozyten von BOHM, HUHN und JUNGWIRTH (3) war es, Antigen-Antikörper-Ansammlungen auf der Erythrozytenoberfläche darzustellen sowie eventuelle Strukturveränderungen der Membran nachzuweisen mit Hilfe der Gefrierätztechnik und Rasterelektronenmikroskopie. Die von SALSBURY und CLARGE zuerst beobachteten Membranausstülpungen nach Behandlung von A₁-Antiserum konnten von den Autoren sowohl in Gefrierätztechnik mit dem Durchstrahlungselektronenmikroskop als auch mit dem Rasterelektronenmikroskop bestätigt werden. Die Stellen mit besonders körniger Oberflächenstruktur, welche zur Darstellung kamen, konnten möglicherweise eine Beziehung zu Orten bevorzugter Antigen-Antikörper-Aktivität haben. Obwohl der Erythrozyt, wie vorangehend erwähnt, ein wichtiges, häufig benutztes und viel versprechendes Untersuchungsobjekt für Darstellungsmethoden und biochemische Reaktionen war und ist, bestehen bis heute noch keine einheitlichen Vorstellungen über Struktur und biochemischen Aufbau seiner Hülle mit den dazugehörigen intravitalen, physiologisch ablaufenden Reaktionen. Für die an den Erythrozyten lokalisierten Blutgruppensubstanzen bestehen bisher lediglich biochemische Vorstellungen, ohne dass diese einer sicheren Lokalisation zugeordnet sind.

Etwa in 80 % bestehen diese Blutgruppensubstanzen aus Polysacchariden, und zwar enthalten alle Blutgruppenantigene D-Galaktose, D-Glucosamin, D-Galaktosamin und L-Fucose, die immer endständig sind und leicht abgespalten werden können. Darüber hinaus enthalten die Antigene als Aminosäuren Serin, Theonin und Prolin (2,29).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Bedeutung die Glykokalix der Erythrozyten für die Antigen-Antikörper-Reaktion (Blutgruppenreaktion) hat. Dabei erhebt sich folgende Fragestellung: Findet die Antigen-Antikörper-Reaktion im Bereich der Glykokalix statt? Lässt sich die Glykokalix durch ein eiweiss-spaltendes Enzym (Trypsin) lösen? Wie verhält sich die Antigen-Antikörper-Reaktion nach einer eventuellen Ablösung der mucopolysaccharid-haltigen Oberschicht? Kann eine abgelaufene Antigen-Antikörper-Reaktion enzymatisch gelöst werden?

Eine Auflösung der mit Ruthenium-Rot angefärbten Glykokalix und Oberflächenfilme gelingt nur durch Trypsin, aber nicht durch Hyaluronidase und Kollagenase (SCHWARZ 1975). (26)

Die zu ermittelnden Ergebnisse sollen im Zusammenhang mit den z.Zt. geltenden Meinungen und Überlegungen eine Aussage machen über die immunologische Spezifität der Glykokalix im Rahmen der Antigen-Antikörper-Reaktion der Blutgruppensubstanzen.

Material und Methode

In Glasröhrchen wurden jeweils 1 ml 3,8%iges Natriumcitrat eingefüllt. In diese Glasröhrchen wurden jeweils wiederum 10 ml frisch abgenommenes Vollblut hinzugefügt, womit eine Gerinnungsmöglichkeit nicht mehr gegeben war. Die Röhrchen wurden bei ca. 1000 Umdrehungen pro Minute für die Zeitdauer von 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgezogen. Das Sediment wurde mit dem Volumen des abgezogenen Überstandes in Form von physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und gemischt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Das Sediment wurde wiederum mit dem entsprechenden Volumen an Kochsalzlösung aufgefüllt. Zu diesem Zeitpunkt trennten sich die Wege der jeweiligen Weiterverarbeitung. Ein Teil wurde gleich gefärbt und eingebettet, ein Teil wurde erst mit Trypsin behandelt, ein Teil des Blutes mit der Blutgruppe A wurde erst mit Anti-A behandelt und daraufhin gefärbt und eingebettet. Ein letzter Teil wurde ebenfalls mit Anti-A behandelt, daraufhin einem Trypsinbad ausgesetzt und zum Schluss gefärbt und eingebettet.

1. Färbung und Einbettung

Die Kontrastierung der Glykokalix erfolgte in Anlehnung an D.B.MYERS, T.C.HIGHTON und D.G.RAYNS (21).

Ausgangssubstanzen:

Destillierter Glutaraldehyd ca. 11%ig

Osmiumsäure 4%ig

1/10 M Cacodylat-Puffer pH = 7,2 - 7,4

2/10 M Cacodylat-Puffer pH = 7,2 - 7,4

Rutheniumrot (Merck)

Ausgangslösungen (Fixierlösungen):

A) 1,4 % (Literatur: 1,2 %) Glutaraldehyd-Fixier-Lösung mit

1500 ppm Rutheniumrot:

- 13 ml Glutaraldehyd ca. 11%ig
- + 13 ml 2/10 M Cacodylat-Puffer
- + 74 ml 1/10 M Cacodylat-Puffer
- + 150 mg Rutheniumrot

B) Waschlösung (zwischen den Fixierungen):

- 100 ml 1/10 M Cacodylat-Puffer
- + 80 mg Rutheniumrot (= 800 ppm)

C) 2%ige Osmiumsäure-Nachfixierlösung mit

400 ppm Rutheniumrot.

1 Teil 4%ige wässrige Osmiumsäure

+ 1 Teil Lösung B

Fixierung und Färbung der Erythrozyten:

1. Die in CaCl aufgeschwemmten Zellen zentrifugieren
2. 1 1/2 Std. in Lösung A
3. Zentrifugieren
4. 2 x 20 Min. in Lösung B
5. Zentrifugieren
6. 1 1/2 Std. in Lösung C
7. Zentrifugieren
8. 1 Std. in NaCl 0,9 %
9. Zentrifugieren
10. Einbetten in Agar

Entwässerung und Einbettung der Erythrozyten:

1. 1 Std. in NaCl 0,9 %
 2. 20 Min. in 30 % Aceton
 3. 20 Min. in 50 % Aceton
 4. 1 Std. in 75 % Aceton
 5. 1 Std. in 90 % Aceton
 6. 2 Std. in 100 % Aceton
 7. 2 Std. 1 + 3 (Mikropal / Aceton)
 8. über Nacht 1 + 1 "
 9. 3 Std. 3 + 1 "
 10. über Nacht 9 + 1 "
 11. 24 Std. 100 % Mikropal
 12. 24 Std. Mikropal + Aktivator + Katalysator
-
2. Bei der Trypsinvorbehandlung wurden 1 mg Trypsin (20 000 E / g) in 10 ml 0,2 molaren Trispuffer gegeben, hinzugefügt wurde 1/2 ml Blutsuspension. Das ganze wurde eine halbe Stunde bei 37 ° C inkubiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie unter 1.
 3. Bei der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde Blut der Blutgruppe A rh benutzt. In jeweils 10 ml Erythrozytensuspension wurden 10 Tropfen Anti-A-Serum hinzugegeben, die Suspension wurde durchmischt und 15 Minuten bei 37 ° C inkubiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter 1.
 4. Nach einem Ansatz wie unter 3. beschrieben erfolgte nachträglich eine Trypsinbehandlung wie unter 2. beschrieben. Restbehandlung wie unter 1.

Die Schnitte wurden mit dem Reichert-Austria-Mikrotom OM-U 1 durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Siemens-Elmiskop I bei 80 KV angefertigt. Es wurden von jeder Serie jeweils 10 Aufnahmen geschossen.

Bei der Auszählung der Glykokalixdurchmesser benutzten wir ein willkürliches Gitternetz. Es wurden bei jeder Durchmesserausählung 200 verschiedene Messungen durchgeführt (Leitz-Messlupe).

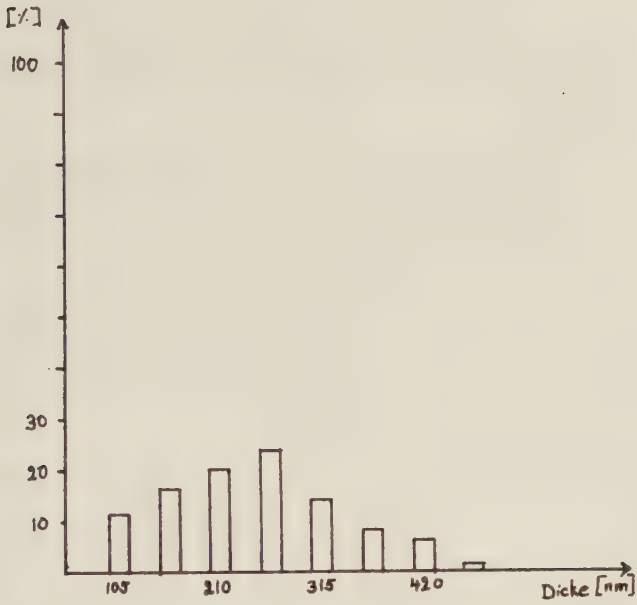
Untersuchungsergebnisse

Zuerst wurden mit Ruthenium-Rot gefärbte unbehandelte Erythrozyten elektronenmikroskopisch unter einer Vergrößerung von 1 : 49.000 (Bild 1) und danach unter einer Vergrößerung von 1 : 105.000 (Bild 2) untersucht. Im Elektronenmikroskop erscheinen die mit RR gefärbten Erythrozyten grau bis schwarz. Im Bild 1 wurden die Querschnitte von Erythrozyten leicht hantelförmig gesehen. In ihrem mittleren Anteil sind sie im Durchmesser dünner als in den Randbezirken. Bei grober Betrachtung erscheinen sie umgeben von einem sich kontrastreich abhebenden schwarzen Oberflächenüberzug (surface coat). Dieser ist leicht gewellt, inhomogen und es ist kein Abstand zur Erythrozytenoberfläche erkennbar. Es sind hier und da klumpige Auflagerungen sichtbar. Im Bild 2 sind nur Ausschnitte von ebenfalls unbehandelten Erythrozyten sichtbar. Dabei fallen vorwiegend nach aussen feinzähnelige, fädig auslaufende Auflagerungen auf, die inhomogen, grau-schwarz gefärbt sind. Der Erythrozytenkörper selbst erscheint homogen, hellgrau von der Auflagerungsschicht abgesetzt. Diese Schicht folgt der Erythrozytenform ohne erkennbaren Zwischenraum. Die Durchmesserverteilung ergibt sich aus folgendem Diagramm:

Dicke (nm)	Anzahl (n = 127)	%
105	14	11
158	20	16
210	26	20
263	31	24
315	18	14
368	10	8
420	7	6
473	1	1
525	0	100

arith. Mittel 231 nm

Diagramm:



Bei der weiteren Untersuchung wurden Erythrozyten der Blutgruppe A mit Antiserum A versetzt, um die Antigen-Antikörper-Reaktion zu verursachen.

Im Bild 3 unter einer Vergrößerung von 1 : 105.000 erscheinen die Erythrozyten zusammengeballt (Agglutination). Die schwarzen Oberflächenschichten (Glykokalices) bilden vorwiegend einen nahezu festen Verband. Zwischen den jeweils miteinander verbundenen Glykokalices besteht teilweise ein messbarer Zwischenraum von durchschnittlich 30 Å, so dass morphologisch eine girlandenförmige Verbindung resultiert (Pfeil).

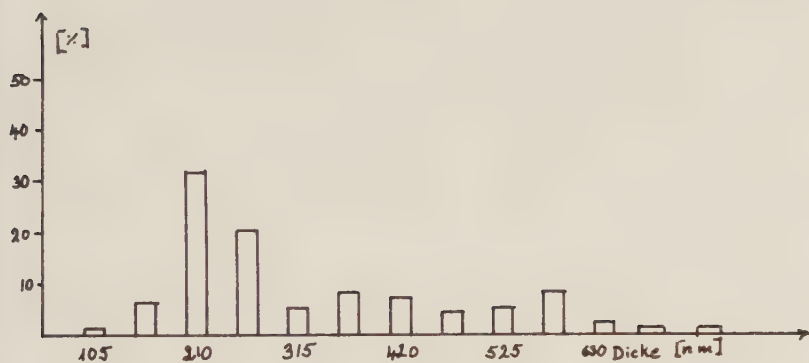
Die miteinander fest verbackenen Glykokalices sind nicht doppelt so dick wie die Summe der einzelnen Oberflächenschichten.

Der Erythrozytenkörper zeigt optisch keine Veränderung.

Diagramm:

Dicke (nm)	Anzahl (n = 131)	%
105	1	1
158	8	6
210	42	32
263	25	20
315	7	5
368	11	8
420	9	7
473	4	4
525	7	5
578	10	8
630	3	2
683	2	1
735	2	1
		100

Diagramm:



Auf dem Bild 4 bei einer Vergrößerung von 1 : 28.000 sind ebenfalls durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion agglutinierte Erythrozyten sichtbar. Sie sind zusammengeballt und im einzelnen von unterschiedlicher Form; es gibt kubische, lanzettförmige, hantelförmige und ellipsoide Erythrozytenkörper, die langstreckig miteinander verhaftet sind. Man erkennt auch hier den nahezu konstant erscheinenden geringen Zwischenraum. Die Erythrozytenkörper erscheinen insgesamt auch hier schwarz-grau gefärbt.

Weiterhin wurden Erythrozyten mit dem Ferment Trypsin behandelt und anschliessend elektronenmikroskopisch untersucht. Bei einer Vergrößerung von 1 : 105.000 sind auf Bild 5 und 6 überhaupt keine Glykokalices mehr erkennbar, denn die Oberfläche erscheint homogen, glatt ohne sichtbare Übergangsmarkierung vom extrazellulären zum intrazellulären Raum. Die Erythrozytenmasse zeigt abwechselnd schwarz-graue körnige Bezirke ohne deutliche Grenzen, wie bei den nicht mit Trypsin behandelten Erythrozyten.

Bei den mit Trypsin vorbehandelten Erythrozyten findet bei Zugabe von Antiserum keine Agglutination statt wie bei der normal ablaufenden Antigen-Antikörper-Reaktion. So sieht man auf dem Bild 7 bei einer Vergrößerung von 1 : 17.500 verschieden gestaltete Erythrozyten, allerdings von vorwiegend rundlicher und ellipsoider Form, ohne erkennbare Zusammenballung. Wie auf Bild 5 und 6 ist auch hier keine Glykokalix sichtbar. Die einzelnen Erythrozyten liegen in verschiedenen

Abständen voneinander. Die Körper zweier der dargestellten Erythrozyten erscheinen von homogen schwarz-grauer Färbung. Bei den anderen Erythrozyten zeigt die Innenfläche abwechselnd hellgraue und schwarz-graue Bezirke ohne scharfe Grenze, manche zeigen vakuolige Aufhellungen. Wie auf Bild 7 bei der gleichen Versuchsanordnung, wird auf Bild 8 bei einer Vergrößerung von 1 : 105.000 keine Antigen-Antikörper-Reaktion erkennbar. Auch hier sind die Glykokalices nicht sichtbar bis auf geringe Rudimente. Der Erythrozytenkörper erscheint auch hier unverändert schwarz-grau.

Bei dem letzten Versuch wurden agglutinierte Erythrozyten im Rahmen einer Antigen-Antikörper-Reaktion anschliessend mit Trypsin behandelt und elektronenmikroskopisch untersucht. Bei einer Vergrößerung von 1 : 105.000 sieht man auf dem Bild 9 Erythrozyten-Abschnitte, welche wiederum nicht zusammengeballt, sondern auseinandergerückt sind. Auffällig sind deutlich schwarz gefärbte Brücken, die sich von Erythrozyt zu Erythrozyt ziehen. Teilweise haften diese schwarzkörnigen Streifen noch flach den Erythrozyten an. Die inneren Flächen aller Erythrozyten zeigen körnige, schwarz-graue und hellgraue Bezirke ohne Auffälligkeiten gegenüber den unbehandelten Erythrozyten.

Bild 1, Nr. E 1545/74

Vergrößerung: 1 : 49.000



Bild 2, Nr. E 2261/74

Vergrößerung: 1 : 105.000



Bild 3, E 9942/74

Vergrößerung: 1 : 105.000

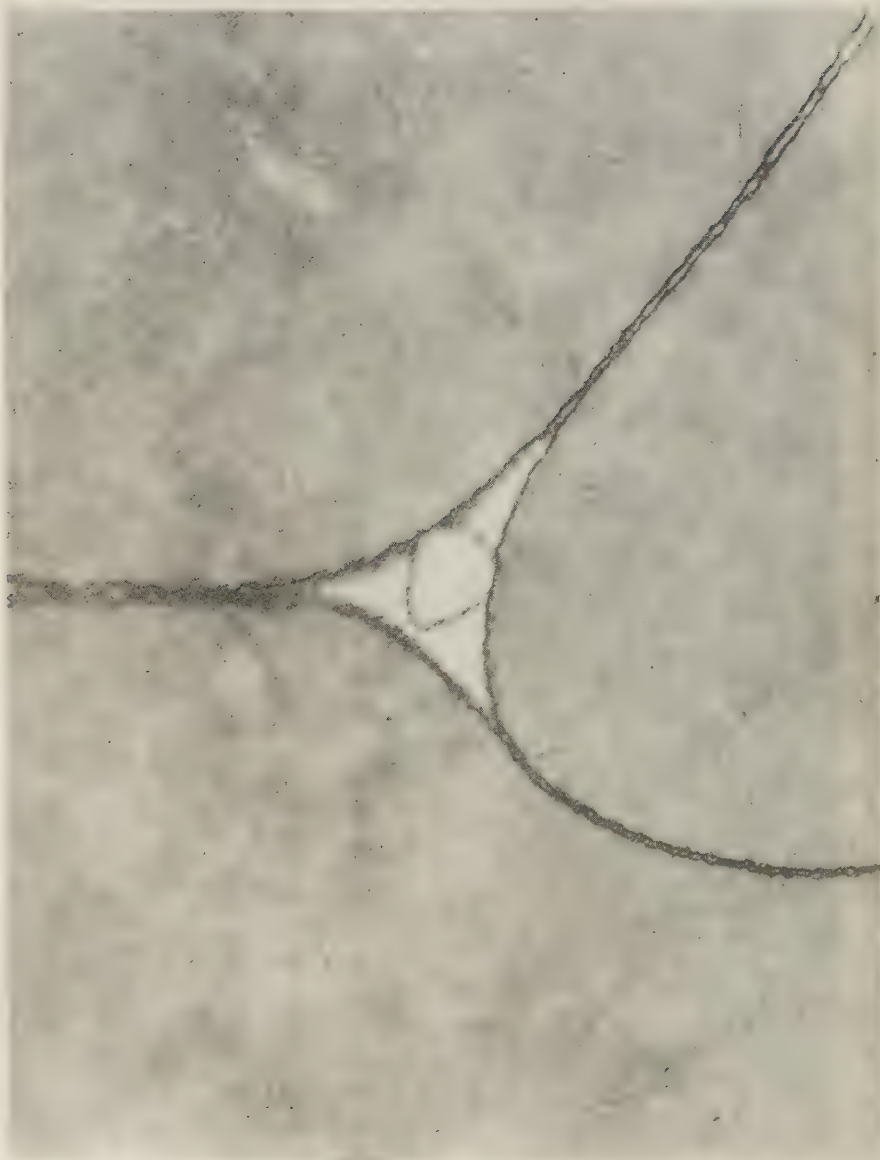


Bild 4, Nr. E 3237/74

Vergrößerung: 1 : 28.000

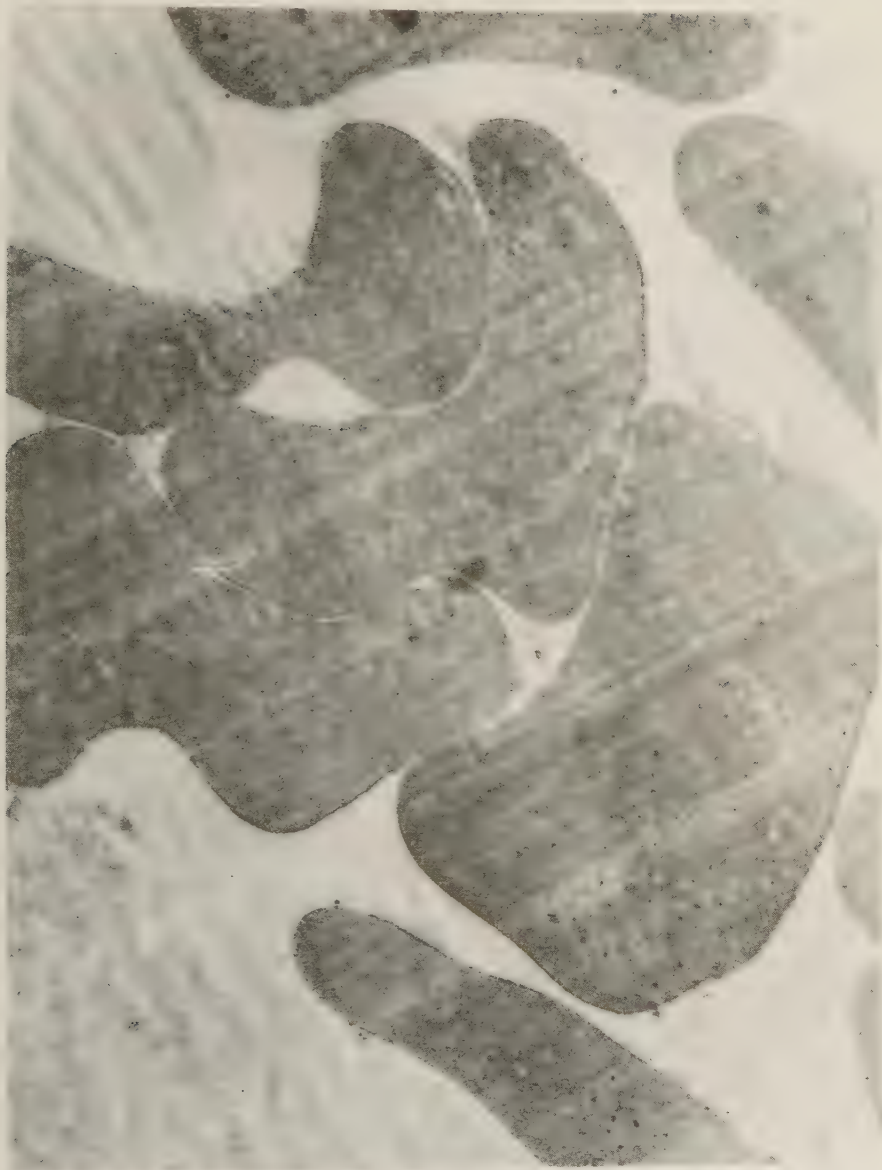


Bild 5, Nr. E 3220/74

Vergrößerung: 1 : 105.000



Bild 6, Nr. E 3222/74

Vergrosserung: 1 : 105.000



Bild 7, Nr. E 9230/74

Vergrößerung: 1 : 17.500

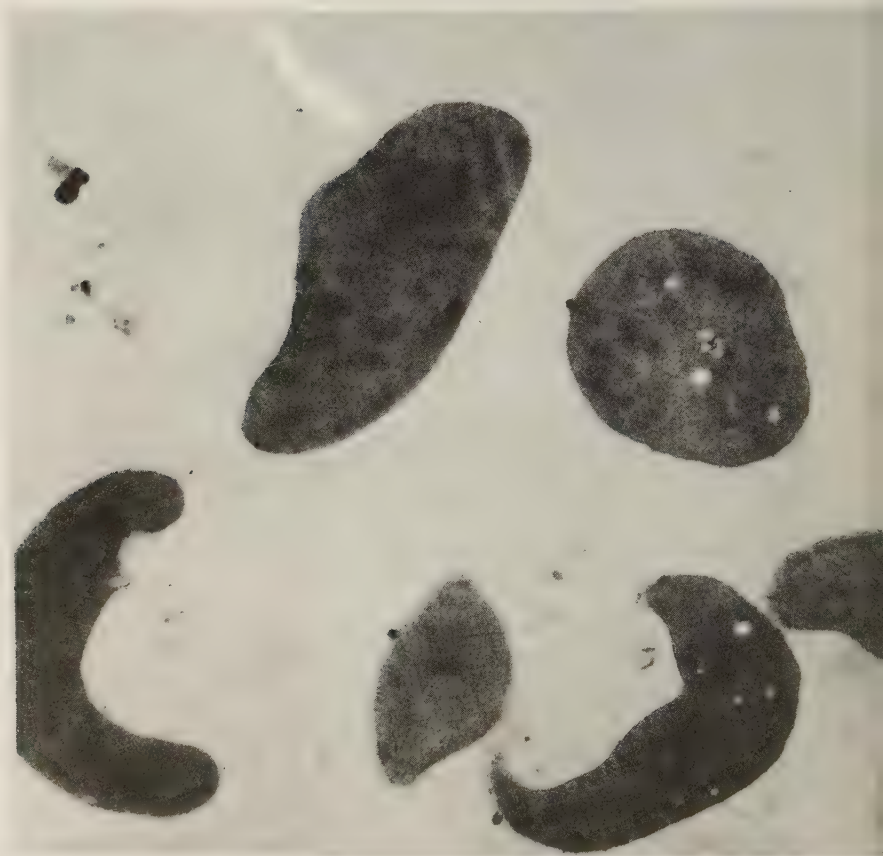


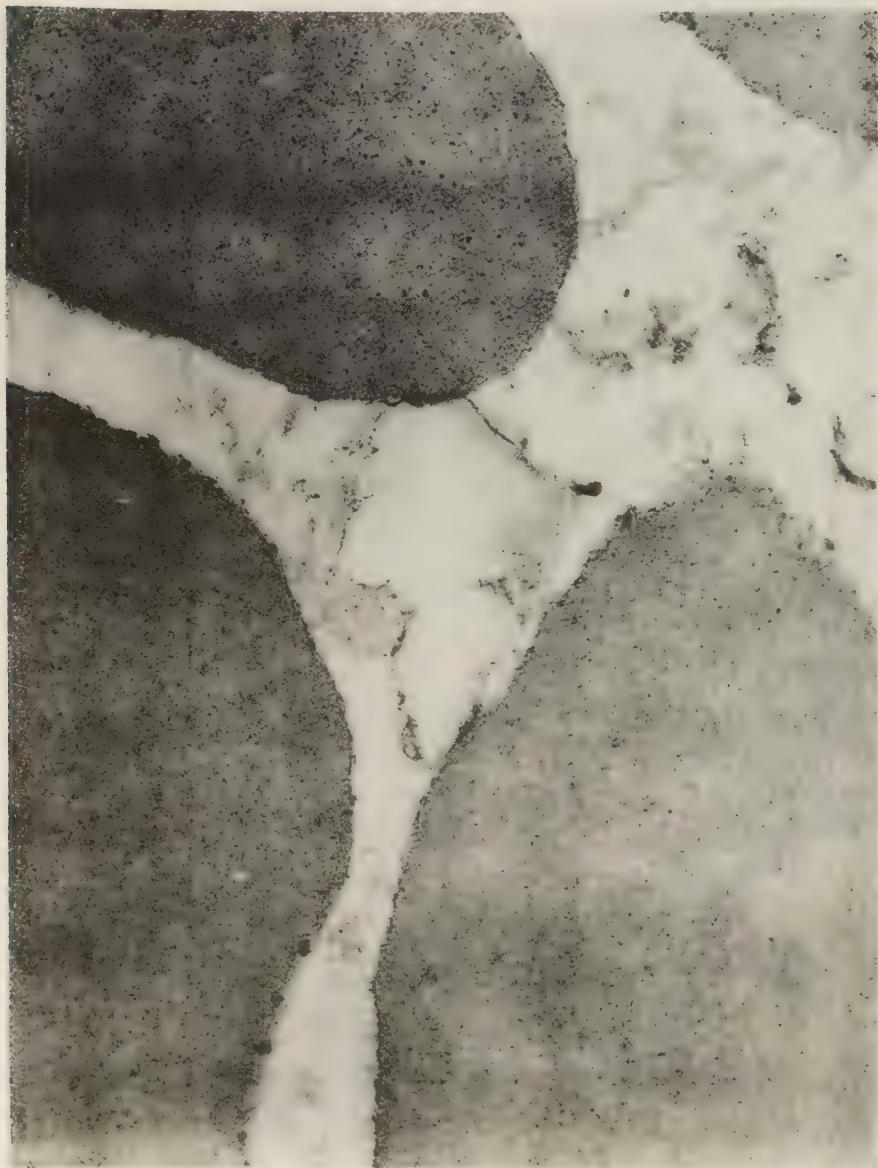
Bild 8, Nr. E 9891/74

Vergrößerung: 1 : 105.000



Bild 9, Nr. E 9964/74

Vergrößerung: 1 : 105.000



Diskussion

In Bild 1 und Bild 2 können wir in unterschiedlichen Vergrößerungen die in der Einleitung ausführlich besprochene Glykokalix nachweisen. Die Glykokalix der Erythrozyten scheint der Oberfläche des Erythrozytenkörpers kontinuierlich zu folgen. Mikrovilli und Krypten, wie eingangs erwähnt, finden wir nicht, jedoch ist die Form der Glykokalix selbst durchaus unterschiedlich. Die unterschiedlichen Dicken werden in der Verteilungskurve verdeutlicht. Die Dicke der Glykokalix steigt dabei schnell zu einem Maximum zwischen 230 und 250 nm an, um dann flach bis zu 500 nm auszulaufen.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion kann in vitro nachgewiesen werden. Wie in Bild 3 ersichtlich, ballen sich die Erythrozyten zusammen. Die Zusammenballung findet im Bereich der Glykokalix statt. Der Zellsaum sowie das Zellinnere zeigen keine elektronenoptischen Veränderungen. Die Zusammenballung ist nicht gleichmässig. Man sieht besonders elektronendichte und auch -lockere Verbundsysteme, teilweise ist dieser Verbund überhaupt nicht eingetreten. Um zu überprüfen, ob hier eine Additionsanlagerung oder jedoch eine feste Vernetzung der Glykokalices eintritt, wird eine Verteilungskurve aufgestellt. Hier zeigt sich ein überraschendes Ergebnis. Man hätte annehmen können, dass zumindest eine Verdickung durch die Zusammenballung zweier Glykokalices eintritt. Dies ist jedoch nur bedingt der Fall. Das Maximum der Glykokalix-Durchmesser liegt wiederum bei 200 bis 250 nm, wobei jedoch die Kurve nach

rechts einen flacher ablaufenden Verlauf zeigt. Man kann sogar vermuten, dass bei der doppelten Glykokalixdicke bei 500 nm nochmal ein kleiner Maximumgipfel auftritt. Hier ist vermutlich nur eine lockere Aneinanderlagerung eingetreten. Aus der Kurve muss eine intensive Reaktion der Glykokalix zweier Erythrozyten vermutet werden, die sogar so weit geht, dass eine Verschmelzung ohne wesentliche Dickenzunahme eintritt.

Bei den trypsinvorbehandelten Erythrozyten ist die Glykokalix restlos abgedaut (Bild 5 und Bild 6). Bei der Durchführung der Antigen-Antikörper-Reaktion dieser speziell behandelten Erythrozyten tritt keine Zusammenballung ein. Man kann daraus schliessen, dass die Glykokalix zur Antigen-Antikörper-Reaktion von Blutgruppensubstanzen zwingend notwendig ist. Die Oberfläche dieser Erythrozyten wird bei der Antigen-Antikörper-Reaktion gegenüber den Erythrozyten, die lediglich trypsinvorbehandelt waren, nicht verändert. Auch dort, wo noch rudimentäre Reste einer Glykokalix an den Erythrozyten-Oberflächen erhalten sind, sieht man keine Reaktion im Sinne einer Zusammenballung. Durch das Trypsin scheint sich also auch die Qualität der Glykokalix, wenn sie noch in Resten vorhanden war, zu verändern.

Auffällig ist das Verhalten von durch die Antigen-Antikörper-Reaktion zusammengeballten Erythrozyten. Bei der Trypsin-Nachbehandlung rücken diese Erythrozyten wieder auseinander. Sie sind teilweise noch durch Glykokalixstreifen locker miteinander vernetzt, die wie Bänder von Erythrozyt zu Erythrozyt

ziehen. Man kann daraus schliessen, dass noch eine Lyse der zusammengeballten Erythrozyten möglich war. Die Glykokalix jedoch, welche im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion wie hier bereits reagiert hat, scheint etwas weniger durch das Trypsin angreifbar geworden zu sein. Man kann offenbar durch eine solche Reaktion eine Stabilisierung gegenüber dem Trypsin erreichen, während die Ablösung der Glykokalix von der Erythrozyten-Oberfläche weiterhin durch Trypsin möglich war.

Zusammenfassung

Es konnte die Glykokalix von Erythrozyten mittels einer Ruthenium-Rotfärbung nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Antiserum wurde eine Antigen-Antikörper-Reaktion in vitro herbeigeführt, wobei eine Zusammenballung im Bereich der Glykokalix elektronenoptisch sichtbar wurde, allerdings mit einem Zwischenraum von durchschnittlich 30 Å. Eine Reaktion des Erythrozytenkörpers selbst war nicht erkennbar.

Als weiterer Nachweis für die Antigen-Antikörper-Reaktion im Bereich der Glykokalix wurde diese durch Trypsin abgedaut, und zwar ausschliesslich durch dieses Ferment. Eine Behandlung mit Antiserum zeigte daraufhin keine Reaktion. Durch eine Nachbehandlung der durch die Antigen-Antikörper-Reaktion zusammengeballten Erythrozyten mit Trypsin konnte der Verband wieder gelöst werden, wobei durch den isolierten Nachweis von frei gelösten Glykokalixsträngen vermutet wurde, dass durch die Antigen-Antikörper-Reaktion die Glykokalix in eine stabilere Phase überführt wird.

Literaturverzeichnis

1.
Armin, E., Friess und Liebich, H.G.:
Ultrahistochemische Untersuchungen an der
Glykokalix von Lymphozyten aus dem Ductus thoracicus
der Ratte.
Z.f.Zellforsch.
134, 143-152 1972
2.
Bennett, Stanley H.:
Morphological aspects of extracellular polysaccharides.
Department of Anatomy
The University of Chicago, Chicago/Ill.
Received for publication September 13, 1962
3.
Böhm, E., Huhn, D. und Jungwirth, J.:
Beiträge zur Gerichtlichen Medizin
185-191 1972
4.
Bourne, C.H., Danielli, J.F.;
International Review of Cytology
Academic Press New York and London, 1971
5.
Davis, Bernhard D., Warren, Leonhard, Editors:
The specificity of cell surfaces
Prentice-Hall, Inc.
Englewood Cliffs, New Jersey
6.
Capaldi, Roderick A.:
A Dynamic Model of Cell Membranes
Scientific American, March 1974

7.
Curtis, A.S.G.:
The cell surface: Its molecular role in morphogenesis.
Logos Press
Academic Press 1967
8.
Abert, W., Metz, J., Weicker, H. und Roelcke, D.:
Die Ficin-katalysierte Fragmentierung von
Erythrozytenmembran-Glykoproteinen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
Bd. 352, 1309-1318, Oktober 1971
9.
Fawcett, Don W.:
Atlas zur Elektronenmikroskopie der Zelle.
Urban & Schwarzenberg, München - Berlin - Wien, 1973
10.
Gauer, Kramer, Jung:
Physiologie des Menschen, Band 5:
Blut, von Kaboth und Begemann.
Urban & Schwarzenberg
11.
Gebbers, J.O. und Otto, H.F.:
Das Membranverhalten der interepithelialen Lymphozyten.
Virchow's Arch., Abt. A.
Path. Anat., 361, 175-184 1973
12.
Geyer, G. und Linss, W.:
Zur quantitativen Erfassung ultrahistocnemischer
Reaktionsprodukte an Membranflächen von Erythrozyten-
schatten.
Z. f. mikroskopisch-anatom. Forsch., Leipzig
1, 85-96 1973

13.

Hale:

Histochemical demonstration of acid polysaccharides
in animal tissues.

Nature, 157, S. 802, 1946

14.

Huhn, D., Pauli, G.D. und Grassmann, D.:

Die Erythrozytenmembran.

Feinstruktur der gefriergeätzten Membran nach
Einwirkung von hypotonen Lösungen und Saponin.

Klin.Wochenschr. 48, 939-943, 1.Aug. 1970

15.

Jung, F.:

Struktur der Erythrozytenmembran.

Folia Haemat., Leipzig

90, 182-195 1968

16.

Luft, John H.:

Chemistry, purification, methodes of use for
electron.microscopy and mechanism of action.

The Anatom.Record

171, 347-368 1971

17.

Luft, John H.:

Ruthenium Red and Violet.

Fine structural localization in animal tissues.

The Anatomical Record

171, 369-416 1971

18.

v.Mayersbach:

Reale: Grundriss der Histologie des Menschen.

Bd. 3, Elektronenmikroskopie der Zellen und Gewebe.

G.Fischer Verlag, Stuttgart

19.
Merker, H.J. und Günther, Th.:
Die elektronenmikroskopische Darstellung
von Glykosaminoglykanen im Gewebe mit Ruthenium-Rot.
Histochemie, Bd. 34, 293-303 1973
20.
Metz, J., Ebert, W. und Weicker, H.:
Gaschromatographische Analyse des Protein- und
Kohlenhydratanteiles von Erythrozytenmembranglykoproteinen.
Clin.Chem.Acta
34, 31-46 August 1971
21.
Myers, D.B., Highton, T.C. and Rayns, D.G.:
J.Ultrastruc.Res.,
28, S.203 1969
22.
Rambourg, Neutra, Leblond:
Presence of a cell coat rich in carbohydrate at the
surface of cells in the rat.
The Anatom.Record
154, 41-71 1966
23.
Revel:
A stain for the ultrastructural localization of
acid mucopolysaccharides.
Journ.Microscopie
3, 535-544 1964
24.
Richter, I.E.:
Gestalt und Oberfläche von Zellen im Raster-Elektronen-
mikroskop.
Zeitschr.f.wissenschaftl.Mikroskopie und
mikroskopische Technik.
Bd. 70, 39-48 1970-1971

25.
Roelcke, D., Uhlenbruck, G. und Metaxas, N.:
Untersuchungen über die serologische Spezifität
neuraminsäurehaltiger Rezeptoren auf Humanerythrozyten.
Z. Immun.Forsch.
Bd. 141, 141-151 1971
26.
Schwarz, W.:
Persönliche Mitteilung.
Anatom.Institut, F.U. Berlin
27.
Seligman:
Histochemical demonstration of some oxidiced
macromolecules with thiocarbohydric acid of thiosemi-
carbozide and osmium tetroxide.
J.Histochem.Cytochem.
13, 629-639 1965
28.
Spicer, S.S. and Warren, L.:
Histochemistry of Sialic-acid containing Mucoproteins.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry,
March 1960.
The Williams and Wilkins Comp.
29.
Uhlenbruck, G., Rothe, A. und Pardoe, G.I.:
Zeitschrift für Immunitätsforschung, Allergie und
klin. Immunologie.
Bd. 136, 79-97 1968
30.
Wallraff, Josef:
Leitfaden der Histologie des Menschen.
6. Auflage
Urban & Schwarzenberg

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	2
Material und Methode	9
Untersuchungsergebnisse	13
Diskussion	29
Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33

Für klare Anleitung, viele Hinweise und Vorschläge
sowie die überaus grosse menschliche Aufgeschlossenheit
danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr.med.
W. S c h w a r z , Direktor des Anatomischen Instituts
der Freien Universität Berlin, sehr herzlich.

Ebenfalls danke ich Frau Vogel für ihre technische
Unterstützung.

Lebenslauf

Am 22.2.1937 wurde ich als Sohn des Christos Sykiotis und seiner Ehefrau Aglaia Sykiotis in Agios Konstantinos/Lokridos, Griechenland, geboren.

In meinem Heimatort besuchte ich die Volksschule und anschliessend das humanistische Gymnasium in der Kreisstadt Lamia. Das Abitur absolvierte ich 1955 am VIII. Humanistischen Gymnasium von Athen.

Nach dem Tode meines Vaters musste ich zwei Jahre das väterliche Erbe verwalten und begann im Wintersemester 1957 das medizinische Studium an der Freien Universität Berlin, wo ich ohne Wechsel das medizinische Staatsexamen am 27. April 1965 ablegte.

Nach der Medizinalassistentenzeit und 1 1/2-jährigem Militärdienst in meiner Heimat begann ich am 1.7.1968 mit der Facharztausbildung in der Chirurgie.

1969 heiratete ich Fotini Karypiadis; unser Sohn Christos Sykiotis wurde am 12.12.1973 geboren.

Im Januar 1974 wurde ich Facharzt für Chirurgie und im Juni des gleichen Jahres Oberarzt an der Chirurgischen Abteilung des Paulinen-Krankenhauses zu Berlin 19, Eschenallee 28-30, wo ich z.Zt. tätig bin.

